

Abstract of JP6016693

PURPOSE:To provide a process for the purification of hemoglobin from erythrocyte minimizing the denaturation of hemoglobin in the purification process. **CONSTITUTION:**Hemoglobin is purified from erythrocyte after converting the hemoglobin in the erythrocyte into CO-hemoglobin by treating the erythrocyte with carbon monoxide.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-16693

(43)公開日 平成6年(1994)1月25日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 3/12		8517-4H		
A 6 1 K 35/18		7431-4C		
37/14		8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数5(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平4-56372

(22)出願日 平成4年(1992)2月5日

(71)出願人 000002336

財団法人生産開発科学研究所
京都府京都市左京区下鴨森本町15番地

(71)出願人 000004341

日本油脂株式会社
東京都千代田区有楽町1丁目10番1号

(72)発明者 土田 英俊

東京都練馬区関町南2丁目10番10号

(72)発明者 武岡 真司

東京都新宿区西早稲田1丁目3番19号 グ
リーンハイツ早稲田201号

(74)代理人 弁理士 安藤 順一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘモグロビン精製法

(57)【要約】

【目的】 赤血球からヘモグロビンを精製する工程におけるヘモグロビンの変性が可及的に抑制できるヘモグロビン精製法を提供する。

【構成】 赤血球からヘモグロビンを精製するに当たって、赤血球中を一酸化炭素処理して該赤血球中のヘモグロビンをCO化ヘモグロビンとした後に精製する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 赤血球からヘモグロビンを精製するに当って、赤血球中を一酸化炭素処理して該赤血球中のヘモグロビンをCO化ヘモグロビンとした後に精製することを特徴とするヘモグロビン精製法。

【請求項2】 赤血球からヘモグロビンを精製するに当って、赤血球中を一酸化炭素処理して該赤血球中のヘモグロビンをCO化ヘモグロビンとした後、当該赤血球を有機溶媒処理して溶血とストローマ除去とを同時に行うことを特徴とするヘモグロビン精製法。

【請求項3】 赤血球からヘモグロビンを精製するに当って、赤血球中を一酸化炭素処理して該赤血球中のヘモグロビンをCO化ヘモグロビンとした後、当該赤血球からCO化ヘモグロビンを得、これを加熱処理して共雑蛋白質除去を行うことを特徴とするヘモグロビン精製法。

【請求項4】 赤血球からヘモグロビンを精製するに当って、赤血球中を一酸化炭素処理して該赤血球中のヘモグロビンをCO化ヘモグロビンとした後、当該赤血球を有機溶媒処理して溶血とストローマ除去とを同時に行い、次いで加熱処理して共雑蛋白質除去を行うことを特徴とするヘモグロビン精製法。

【請求項5】 赤血球液に一酸化炭素を通気することによって赤血球中を一酸化炭素処理する請求項1乃至請求項4のいずれかに記載のヘモグロビン精製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、赤血球由来のヘモグロビンの精製法に関し、ヘモグロビン精製工程においてヘモグロビンの変性を可及的に抑制することができる新規技術手段を提供するものであり、医用分野、製薬分野等において利用される。

【0002】

【従来の技術】事故や医療手術の際には、汚染されていない血液が確実に、かつ迅速に供給される必要があるため、代替血液の要請は非常に強いものがある。わが国では、日赤血液センターが献血により集め、これが輸血医療に広く使用されているが、血液適合性に個体差が大きいこと、ウイルス汚染が懸念されること、及び慎重に検定されて合格した血液でも三週間期限内で新鮮を失ったとして処分されていることなどが原因で、利用効率が低く、コスト高ともなっている。また、血しょう増量剤、抗生物質、凝固促進剤などの開発によって血液の持っている機能のうち、酸素運搬能以外の機能は何らかの代替物が実用化されているが、人工酸素運搬体はまだ発展途上の段階にあり、しかも、最近の肝炎やAIDSなどのウイルス感染症の蔓延によって、益々安全な酸素運搬体に関する需要が高まっており、現在盛んに研究されている。

【0003】人工酸素運搬体は大きく次の三つに分類される。第一は物理的に酸素溶解度の極めて高い人工物で

ある PFC (Perfluoro-Carbon-Emulsion) であり、認可されているものの、酸素運搬量が少ないことや、代謝・免疫系への影響においていまだ満足する結果は得られていない。

【0004】第二は赤血球中にある酸素運搬機能を有する蛋白質ヘモグロビンを化学的に修飾、或はリン脂質小胞体中に内包した系であり、第三はヘモグロビン中の酸素結合部位であるポルフィリンの誘導体を合成してリン脂質二分子層膜中に包埋させた系である。

【0005】第二番目の人工酸素運搬体では、期限切れ赤血球由来のヘモグロビンが原料に用いられており、献血により集められた赤血球の有効利用につながることも、大いに注目を集めている。そして、赤血球の有効利用に当っては、ヘモグロビンを可及的に変性させずに赤血球膜成分や共雑蛋白質が完全に除去されたウイルスフリーのヘモグロビンを大量に得ることができる技術手段の確立が急務とされている。

【0006】従来、赤血球からヘモグロビンを精製する技術手段として、次の各種技術手段が実施或いは報告されている。先ず、現在最も一般的なヘモグロビン精製法は、洗浄赤血球に脱イオン水（あるいは低張液）を添加して溶血し、遠心分離により単離した後に濃縮する方法（Rabiner, S.F. et al., J. Exp. Med., 126, 1127 (1967)）である。

【0007】また、有機溶媒を用いた赤血球の溶血法とストローマ成分の除去法が幾つか報告されており、四塩化炭素を用いた方法（Schroeder, W.A., et al., "The Chromatography of Hemoglobin," Dekker, New York (1980)）、トルエンを用いた方法（Farnell, K.J., Arch, Biochem. Biophys., 158, 702, (1973)）、クロロホルムを用いた方法（Pristoupil, T.I., Int. J. Artif. Org., 13, 383 (1990)）がある。

【0008】また、ヘモグロビン溶液の加熱処理法（60℃、～10hr）による共雑蛋白質の除去とウイルスの不活性化がPristoupilらによって報告されている（Pristoupil, T.I., Int. J. Artif. Org., 13, 383 (1990)）。

【0009】さらに、精製ヘモグロビン溶液をCO化してメト化を防止する方法が報告されている（Antonini, E., et al., "Methods in Enzymology vol. 76, Hemoglobins", p.9, Academic Press, 1981）。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】よく知られている通り、ヘモグロビンは不安定であり、速やかに酸化してメト体となるため、赤血球からヘモグロビンを精製するに当って実用できる精製法は限られており、また、その精製効率も十分なものとは言い難いという問題がある。

【0011】即ち、前記イオン水（あるいは低張液）を用いる方法にあつては、処理中にヘモグロビンがメト化、変性することや溶血時にHb濃度が8wt%程度にまで希釈されるので濃縮（[Hb] : 30～40g/dl）にかなりの

時間と手間がかかることなどの問題点がある。

【0012】また、前記有機溶媒を用いる方法にあっても、処理中のヘモグロビンの変性とそれによる収率の低下という問題点があり、また、いずれも希薄溶液での処理であるため精製後の濃縮が問題となる。

【0013】また、前記加熱処理法にあつては、等電点電気泳動法による分析及び酸素親和性測定において特に異常は認められないものの (Estep, T.N., Biomat., Art. Cells, Art. Org., 16(1-3), 129 (1988))、ヘモグロビンはデオキシ状態にして加熱処理しなければならないため、操作の煩雑さと条件の厳密さが要求されるという問題点がある。

【0014】もっとも、前記精製ヘモグロビン溶液をC0化する方法を用いてヘモグロビンをC0化させてから前記の諸方法を実施すれば、前記諸方法に内存する問題点はかなり解決される。しかしながら、精製ヘモグロビン溶液のC0化操作の際に必然的に生じる溶液の泡立ちがヘモグロビンの変性や反応効率を低下させることになり、大きな問題点となっているのである。

【0015】本発明者等は、人工酸素運搬体について永年にわたり系統的な研究を重ねているものであるが、期限切れ赤血球有効利用の観点から、赤血球からヘモグロビンを可及的に変性させることなく、かつ収率よく精製できる技術手段を確立することを技術的課題として鋭意努力した結果、上記諸問題点を解決し、当該課題を達成した。

【0016】

【課題を解決するための手段】前記技術的課題は、次の通りの本発明によって達成できる。即ち、本発明は、赤血球からヘモグロビン（以下「Hb」とする）を精製するに当って、赤血球中を一酸化炭素処理して該赤血球中のHbをC0化Hbとした後に精製することを特徴とするHb精製法である。

【0017】本発明の構成を詳しく説明すれば次の通りである。まず、本発明におけるC0化は赤血球液に一酸化炭素を通気することによって行える。より効率よく行うには、ホローファイバーモジュール型人工肺の使用が好適である。通気によってHbの95%以上がC0化されていることを確認した後、遠心分離（例えば、 $2,000 \times g$ ）によって濃厚赤血球液を得る。

【0018】本発明においては、赤血球の段階でHbをC0錯体としており、このC0化Hbには、通常のC0化していないHbでは変性が起こるような操作や条件を積極的に採用して精製が行える。精製には従来知られている各種の方法が適用できるが、C0化Hbの特長を活かした好ましい溶血、ストローマ除去は有機溶剤処理法の適用である。上記濃厚赤血球液に、等容量以上の $C_nH_{(2n+2-m)}X$ （X：ハロゲン）で示されるハロゲン化炭化水素（例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、テトラクロロメタン、テトラクロロエタン）や、トルエン、ベンゼンな

どの芳香族系炭化水素、ジエチルエーテルなどの有機溶媒を添加し、激しく振盪、遠心した後、有機溶媒層と中層の固形物の層を分離し、Hb溶液層を得る。この操作を二回以上行い、ストローマの無いC0化Hb溶液を得る。この場合、赤血球を濃厚液の状態で処理するため、溶血液のHb濃度は $24g/dl$ 以上となり、濃縮操作が大幅に短縮される。

【0019】また、C0化Hbの特長を活かした共雑蛋白質の除去は加熱処理法の適用である。加熱処理操作時にウイルスの不活性化も行うことができる。即ち、赤血球中にはHb以外にも脱炭酸酵素等の水溶性蛋白質が数多く存在し、これらは有機溶媒処理では除去できない。一般に、蛋白質は熱に対して不安定であり熱変性により凝集沈殿するから、加熱処理により熱に対して安定なC0化Hbから共雑蛋白質を容易に分離できる。また、一般にウイルス不活性化は $60^\circ C$ 以上で10時間程度処理すると完全に行えることから、共雑蛋白質を除去する加熱処理で同時にウイルスの不活性化も行える。なお、C0化していないHbにこれらの操作を施すと、速やかにメト体、次いで変性体へと移行してしまう。分離は、 $80^\circ C$ 以下の温度での加熱処理後に遠心分離や濾過操作で容易に行える。凝集体は $2,000 \times g$ 程度の低い回転数で十分に分離され、更に除去を完全なものとするには、孔径 $0.2 \mu m$ のフィルターを通過させればよい。

【0020】

【作用】前記の通りの構成を採る本発明の作用は次の通りである。本発明は、赤血球の段階でHbのC0化を行うことを最大の特徴としており、本発明においては、Hbは赤血球中にあるので一酸化炭素の通気によって生じる泡でHbが変性することは無い。そして、C0化Hbは安定であるので、溶血、ストローマ除去、更なるHbの精製には、どのような従来法も適用でき、しかもメト化率の進行は殆ど抑えられる。また、温度や雰囲気等の操作条件に注意を払わなくてもよいので、簡略化され、大量調製が可能となる。

【0021】

【実施例】次に、代表的な実施例を挙げて本発明をより詳しく説明する。

【0022】実施例1

期限切れの人血（保存血）5 l を人工肺 CAP10X 350（商品名：テルモ社製）に通し、C0ガスを通気することによってC0化赤血球とする。人血の流速を $500 ml/min$ とし30分間循環させることによりHbのC0化率は98.5%に達した。次に、 $4^\circ C$ にて遠心分離（ $2,000 \times g$ ）を行い、下層の赤血球を回収し、更に等容量の生理食塩水を添加して攪拌後、遠心分離して洗浄する。この操作を四回繰り返して得られたC0化洗浄赤血球は $900 ml$ 、Hb濃度は $26.4 g/dl$ であった。

【0023】次に、上記C0化洗浄赤血球（ $850 ml$ 、 $26.3 g/dl$ ）に等容量のクロロホルムを添加、約5分間激しく

振盪後、遠心分離（3,000回転、20分）にてC0化Hb溶液（620ml、24.9g/dl）を上層に得る。最下層のクロロホルム層と、中層の固形物層にはストローマ成分が存在した。一回目の洗浄の際、桃色の固形物層が体積比で15%得られるが、二回目では、固形物の量は2%程度に減少する。三回まで繰り返した後、遮光減圧下で攪拌することにより残存しているクロロホルムを除去した。このとき、シアンメト法により求めたメト化率は0.5%であった。

【0024】得られたC0化Hb溶液の残存リン脂質成分の確認は、Bligh & Dier法の変法に従って抽出し、HPLC分析を行った。カラムはTSK gel-Silica 60、溶離液はCH₃CN / CH₃OH / 85%リン酸（900 / 95 / 5）、流速1.0ml/min、検出波長210nmの条件で測定した。上記C0化洗浄赤血球から抽出した脂質成分のクロマトチャートでは、溶出の速いものから、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルコリン（PC）に帰属される。このC0化洗浄赤血球の90倍に相当する量のC0化Hb溶液をクロロホルム処理し、同様にリン脂質成分を抽出してHPLC測定した。単位Hbに対するリン脂質成分の減少率を計算し、表1に示す。

【0025】

【表1】

クロロホルム処理によるリン脂質成分の除去率

リン脂質	PS	PE	PC
減少率	1/984	1/1218	1/261

【0026】次に、HPLCにてHb変性の有無の確認をした。カラムはTSK gel-S-P-NPR（4.6mm×3.5cm）、溶離液はA：20mMピストリス-HCl緩衝液（pH 6.0）、B：A+0.2M-NaCl、A/B（75/25）→B直線グラジエント（3分）、流速1.5ml/min、検出波長：419nmにて行った。常法の低張溶血法で精製したC0化HbのHPLCクロマトチャートにおいて、約0.3、0.6、2.0分に溶出する物質は、HbF、HbA_{1c}、他の微量HbA₁成分に帰属される。約2.5分に検出される大きなピークはHbA₀である。次にクロロホルム洗浄したC0化Hbについて測定を行ったが、クロマトチャートはほぼ溶血液と等しく、変性は認められなかった。

【0027】更に、得られたC0化Hb溶液の酸素親和性測定を行った。Hbに対し、1モル当量の2，3-ジホスホグリセリン酸を添加し、ヘモックスアナライザー（商品名：TCS Medical Products 社製（米国））にて測定した（pH 7.4のヘモックス緩衝液中、37℃）。常法に従い精製したHbはヒル係数2.5、P₅₀は24torrを示したのに対し、クロロホルム処理後のHbはそれぞれ2.5、26torrであり、Hbの変性は確認されなかった。

【0028】次に、クロロホルム処理したC0化Hb溶液（620ml、24.9g/dl、C0化率99.8%）を1リットルの三角フラスコに封入し、遮光下加熱処理（60℃、10時間）した。沈澱物や浮遊物を遠心分離（2,000×g）したあと、ポリカーボネート製メンブレンフィルター（孔径0.2μm、膜面積3.4cm²：ニウクレポアー社製）を通過させて精製Hb溶液を約500ml（24.9g/dl）を得た。この加熱処理したHbのヒル係数、P₅₀はそれぞれ2.5、25torrであり、Hbの変性は確認されなかった。加熱処理後のHbについてのHPLC分析結果は、何の相違も認めなかった。検出波長を280nmとして同様に測定したところ、溶血液ではHb以外の成分が0.2分に認められた。これはHbよりも低いpIを有する蛋白質（例：脱炭酸酵素、pI：6.4）が検出されたものと思われる。加熱処理後の系では0.2分のピーク面積は80%以上減少し、共雑蛋白質が除去されたことを示している。また、薄層等電電気泳動分析では、溶血液では認められたHb（HbA₀、HbA_{1c}、HbF等）以外の共雑蛋白質のバンド、例えば脱炭酸酵素などが、加熱処理後消失しており、共雑蛋白質の除去を確認した。得られた精製C0化Hb溶液（600ml、24.9g/dl、C0化率99.8%）の濃縮は、限外濾過膜（PTTK、限外分子量30,000、濾過面積5.0ft²：ミリポア社製）を装填したペリコンカセットシステム（ミリポア社製）を通過させて行い、Hb濃度47wt%まで濃縮することができた。

【0029】実施例2

期限切れ濃厚赤血球パック（1.0l、Hb濃度24.8g/dl、メト化率0.45%）を1.0lの生理食塩水で希釈して5リットルの三角フラスコに入れた。フラスコ内の空気をC0ガスで置換した後、10分間激しく振盪した。この操作を二回繰り返して、C0化率98%の赤血球を得た。次に、4℃にて遠心分離（2,000×g）を行い、下層の赤血球を回収し、更に等容量の生理食塩水を添加して攪拌後、遠心分離して洗浄する操作を四回繰り返した。HbのC0化率は95.7%であった。得られたC0化洗浄赤血球は410ml、Hb濃度は25.4g/dlであった。以下の有機溶媒処理、加熱処理は実施例1記載の方法に従って、精製Hb溶液を得た。

【0030】実施例3

期限切れ濃厚赤血球パック（5.0l、Hb濃度24.8g/dl、メト化率0.45%）を、実施例1に記載の人工肺を用いる方法でC0化した。赤血球の流速は500ml/minとし、C0ガスを通気させ、30分間循環させることによりHbのC0化率は99.3%に達した。次に、このC0化赤血球に等容量の生理食塩水を添加して遠心分離する洗浄操作を二回繰り返した。得られた濃厚C0化洗浄赤血球溶液は4.7l、Hb濃度は26.3g/dlであった。以下の有機溶媒処理、加熱処理は実施例1記載の方法に従って、精製Hb溶液を得た。

【0031】実施例4

期限切れ濃厚赤血球パック（1.0l、Hb濃度24.8g/dl、メト化率0.4%）を攪拌（500回転/分）しながら、実施

例2と同様に、COガスを50ml/minの速度で30分間バブルした。このとき、HbのCO化率は95.3%であった。次に、実施例3記載の洗浄操作を二回繰り返した。得られた濃厚CO化洗浄赤血球溶液は940ml、Hb濃度は26.3g/dlであった。以下の有機溶媒処理、加熱処理は実施例1記載の方法に従って精製Hb溶液を得た。

【0032】実施例5

実施例4記載の方法で得た濃厚CO化洗浄赤血球溶液(26.3g/dl、1.0l)に等容量のジクロロメタンを添加した。約5分間激しく振盪後、遠心分離(3,000回転、20分)にてCO化Hb溶液(800ml、24.3g/dl)を上層に得る。この操作を三回繰り返した後、遮光減圧下で攪拌することにより残存しているジクロロメタンを除去した。このとき、シアンメト法により求めたメト化率は0.5%であった。以下の加熱処理は実施例1記載の方法に従って精製Hb溶液を得た。

【0033】実施例6

実施例4記載の方法で得た濃厚CO化洗浄赤血球(26.3g/dl、500ml)に等容量のジエチルエーテルを添加した。約5分間激しく振盪後、遠心分離(3,000回転、20分)にてCO化Hb溶液(800ml、24.3g/dl)を下層に得る。この操作を三回繰り返した後、遮光減圧下で攪拌することにより残存しているジエチルエーテルを除去した。このとき、メト化率は0.5%であった。以下の加熱処理は実施例1記載の方法に従った。

【0034】実施例7

実施例1のCO化洗浄赤血球(500ml、26.3g/dl)を常法の低張溶血法で溶血後、遠心分離(20,000×g)してストローマを除去した。更に、ポリカーボネート製メンブレンフィルター(孔径0.2μm: ニュクレポア社製)を通過させて残存ストローマを除去し、Hb溶液を約1500ml得た。濃度は7.5g/dlに希釈されていたので限外濾過膜(限外分子量: 3万)を用いて30g/dlに濃縮して精製Hb溶液を得た。

【0035】実施例8

フロントページの続き

(72)発明者 酒井 宏水

東京都練馬区関町南1丁目6番29号 斉藤
博方

実施例7の遠心分離してストローマを除去した段階のCO化Hb溶液(8wt%.4.0l)を、ウイルス除去膜BMM(商品名: 旭化成)を通過させて精製を行った。得られた精製Hb溶液のメト化率は0.3%程度に抑えることができた。残存リン脂質成分の確認を実施例1記載のHPLC法で行ったところ、脂質成分(PS, PE, PC)はそれぞれ、CO化洗浄赤血球の1/906、1/1198、1/221に減少していた。

【0036】実施例9

実施例7の遠心分離してストローマを除去した段階のCO化Hb溶液(8wt%.3.5l)に、実施例1記載の加熱処理を行い、Hb溶液(3.3l)を得た。濃縮は実施例7記載の方法に従って精製Hb溶液を得た。

【0037】実施例10

実施例1のクロロホルム処理して得たCO化Hb溶液(800ml、24.9g/dl)を1リットルの三角フラスコに封入し、遮光下温度を80℃にして加熱処理を5時間した。沈澱物や浮遊物を遠心分離(2,000×g)し、実施例1記載のフィルター処理を行い、精製Hb溶液を約600ml(24.5g/dl)得た。実施例1記載のHb溶液のHPLC分析を行ったが、クロマトチャートには異常は認められなかった。

【0038】

【発明の効果】本発明によれば次の効果を得ることができる。即ち、本発明においては、赤血球の段階でHbをCO錯体にするからHbは赤血球中にあるので一酸化炭素の通気によって生じる泡でHbが変性することなく、このCO化Hbに常法、有機溶媒処理法、加熱処理法によるHb精製を適用しているためHbの変性を可及的に抑制することができる。従って、従来の酸素錯体のまま精製する場合よりも収率、純度の向上が可能である。また、有機溶媒、加熱処理法の適用に当っては高濃度CO化Hb溶液を処理でき、得られるHb溶液も濃厚であり、操作も簡単であり、しかも、加熱処理時にウイルスの不活性化が行えるので、精製Hb溶液の工業的量の生産の一法として推奨できる。

THIS PAGE BLANK (ISPTO)